

**(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG**

**(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum**  
Internationales Büro



**(43) Internationales Veröffentlichungsdatum**  
17. Januar 2002 (17.01.2002)

**PCT**

**(10) Internationale Veröffentlichungsnummer**  
**WO 02/04555 A1**

**(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>:** C08K 9/08, 9/10, G01N 33/50, C12Q 1/00

**(21) Internationales Aktenzeichen:** PCT/EP01/07326

**(22) Internationales Anmeldedatum:**  
27. Juni 2001 (27.06.2001)

**(25) Einreichungssprache:** Deutsch

**(26) Veröffentlichungssprache:** Deutsch

**(30) Angaben zur Priorität:**  
100 33 583.7 11. Juli 2000 (11.07.2000) DE

**(71) Anmelder** (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **BAYER AKTIENGESELLSCHAFT** [DE/DE]; 51368 Leverkusen (DE).

**(72) Erfinder; und**

**(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):** **KARLOU-EYRISCH, Kamelia** [IR/DE]; Lindenstr. 245, 40235 Düsseldorf (DE). **PODSZUN, Wolfgang** [DE/DE]; Roggendorfstr. 55, 51061 Köln (DE). **NEUMANN, Rainer** [DE/DE]; Olefstr.11, 50937 Köln (DE).

**(74) Gemeinsamer Vertreter:** **BAYER AKTIENGESELLSCHAFT**; 51368 Leverkusen (DE).

**(81) Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

**(84) Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



**A1**

**WO 02/04555**

**(54) Title:** SUPERPARAMAGNETIC PEARL POLYMERS

**(54) Bezeichnung:** SUPERPARAMAGNETISCHE PERLPOLYMERISATE

**(57) Abstract:** The invention relates to cross-linked pearl polymers doped with superparamagnetic iron oxide, to a method for producing said pearl polymers, and to their use in nucleic acid diagnostics.

**(57) Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft vernetzte Perlpolymerisate dotiert mit superparamagnetischen Eisenoxid, ein Verfahren zur Herstellung der Perlpolymerisate, sowie deren Verwendung in der Nucleinsäuren Diagnostik.

Superparamagnetische Perlpolymerisate

Die Erfahrung betrifft vernetzte Perlpolymerisate dotiert mit superparamagnetischen Eisenoxid, ein Verfahren zur Herstellung der Perlpolymerisate, sowie deren Verwendung in der Nucleinsäuren Diagnostik.

In jüngster Zeit gewinnt die sogenannte Gen-Diagnostik zunehmend an Bedeutung.

Die Gen-Diagnostik hat Eingang gefunden in die Diagnostik humaner Erkrankungen (u.a. Nachweis von Infektionserregern, Nachweis von Mutationen des Genoms, Entdeckung von zirkulierenden Tumorzellen und Identifizierung von Risikofaktoren für die Prädisposition einer Erkrankung). Aber auch in der Veterinärmedizin, der Umweltanalytik und Nahrungsmitteltestung findet die Gen-Diagnostik mittlerweile ihre Anwendung. Ein weiteres Anwendungsgebiet stellen Untersuchungen an pathologischen-/zytologischen Instituten oder im Rahmen forensischer Fragestellungen dar. Aber auch im Rahmen der Qualitätskontrolle (z.B. Untersuchungen von Blutproben auf Infektionserreger-Freiheit) wird die Gen-Diagnostik mittlerweile eingesetzt und der Gesetzgeber plant, solche Testungen per Gesetz in Zukunft anzuordnen. Methoden, die auch bei der Gen-Diagnostik zum Einsatz kommen (wie z.B. Hybridisierungs- oder Amplifikationstechniken wie die PCR, bDNA oder NASBA Technologie) gehören auch bei wissenschaftlichen Grundlagenarbeiten zu den Routineverfahren.

Bei der Gen-Diagnostik ist die Gewinnung von Gen-Proben aus biologischem Material, wie Zellen, Blut, Serum oder Urin ein wichtiger Teilschritt.

In der EP 0 707 077 wird eine Methode zur Isolierung von Nucleinsäuren aus biologischem Material unter Verwendung von löslichem, schwach basischem Polymer beschrieben. Bei dieser Methode wird in einem sauren pH-Bereich einen Fällungsprodukt aus dem löslichen, schwach basischen Polymer und der Nucleinsäure erzeugt, das Fällungsprodukt von den nicht gefällten Bestandteilen des

biologischen Materials abgetrennt und gewaschen und die Nucleinsäure aus dem Fällungsprodukt durch Einstellung eines basischen pH-Wertes wieder freigesetzt.

5 Ein Nachteil der Methode nach EP 0707 077 besteht darin, dass die Handhabung, insbesondere die Abtrennung und Reinigung des Fällungsproduktes schwierig und sehr zeitaufwendig ist. Diese Methode lässt sich auch nicht bzw. nur unter erschwerten Bedingungen mit Hilfe automatisierter Analysegeräte ausführen.

10 Die US 4339337 und US 5356713 beschreiben Methoden zur Herstellung von magnetischen Beads aus vinylaromatischen Polymer unter Verwendung von magnetischen Partikeln. Diese Perlpolymerisate enthalten allerdings keine funktionellen Gruppen zur Anbindung von Nucleinsäuren. Außerdem zeigen die Beads einen deutlichen Restmagnetismus (Remanenz), wodurch ihre Dispergierbarkeit erschwert wird.

15

In der WO 8303920 wird eine Methode zur Herstellung von magnetischen Polymerpartikeln beschrieben, bei der Polymerpartikel mit Lösungen aus beispielsweise Eisensalz behandelt werden, wobei das Eisen in Form von Eisenhydroxid ausgefällt wird. Bei dieser Methode befindet sich die ausgefällte Eisenverbindung sowohl in 20 den Polymerpartikeln als auch an der Oberfläche der Polymerpartikel. Für einige Anwendungen, beispielsweise für die Amplifikation von Nucleinsäuren durch Taqman-PCR kann die Eisenverbindung an der Oberfläche stören.

25 Die US 5206159 offenbart ein Verfahren zur Herstellung von superparamagnetischen Polyacrylamid-Trägern. Allerdings sind diese Träger zur Abtrennung von Nucleinsäuren ungeeignet.

30 Aus der US 5705628 ist eine Methode zur Bindung von DNA an magnetische Micropartikel bekannt. Die magnetischen Mikropartikel haben vorzugsweise eine Teilchengröße von 1 µm und besitzen eine mit Carboxylgruppen beschichtete Oberfläche. Um eine Anbindung der DNA an die Partikel zu erreichen müssen spezielle Salzkon-

zentration angewendet werden und Polyethylenglycol in definierter Konzentration und mit speziellem Molekulargewicht zugesetzt werden.

Es wurde nun gefunden, dass bestimmte vernetzte Perlpolymerisate, die mit superparamagnetischen Eisenoxid dotiert sind und basische Aminogruppen enthalten, in hervorragender Weise zur direkten und automatisierten Isolierung von Nucleinsäuren geeignet sind.

Gegenstand der Erfindung sind vernetzte Perlpolymerisate dotiert mit superparamagnetischen Eisenoxid und enthaltend basische Aminogruppen, die dadurch gekennzeichnet sind, dass die Perlpolymerisate einpolymerisierte Einheiten aus hydrophilem (Meth)acrylat und Amino(meth)acrylate erhalten.

Unter der Bezeichnung (Meth)acrylat werden die Derivate der Acrylsäure und Methacrylsäure verstanden.

Hydropile (Meth)acrylate sind solche, deren Homopolymerisate in Wasser bei 25°C zu mehr als 2,5 % löslich sind. Beispielhaft seien genannt. 2-Hydroxyethylmethacrylat, 2-Hydroxypropylmethacrylat, 2-Hydroxyethylacrylat, 2-Hydroxypropylacrylat, Triethylenglycolmonomethacrylat, Tetraethylenglycolmonomethacrylat, Glycerinmonomethacrylat, Acrylamid, Methacrylamid und N,N-Dimethylacrylamid. Acrylamid ist bevorzugt.

Amino(meth)acrylate im Sinne der vorliegenden Erfindung sind Derivate der Acrylsäure und Methacrylsäure mit vorzugsweise sekundären und tertiären Aminogruppen. Die Aminogruppen können auch Teil eines cycloaliphatischen oder aromatischen Rings sein. Geeignete Amino(meth)acrylate sind z.B. N-(3-Aminopropyl)methacrylamid, N-(3-Imidazoylpropyl)methacrylamid, N-(2-Imidazoyl-ethyl)methacrylamid, N-(3-Aminopropyl)acrylamid, N-(3-Imidazoylpropyl)-acrylamid, N-(2-Imidazoylethyl)acrylamid, N-(1,1-Dimethyl-3-Imidazoylpropyl)-methacrylamid, N-(1,1-Dimethyl-3-Imidazoylpropyl)acrylamid, N-(3-Benzimida-

5 zoylpropyl)-methacrylamid und (3-Benzimidazoylpropyl)acrylamid. Bevorzugte Amino(meth)acrylate sind Aminoalkyl(meth)acrylate, wie z.B. N,N-Dimethylaminoethylmethacrylat, N,N-Dimethylaminopropylmethacrylat, N,N-Dimethylaminoethylacrylat, und N-tert.-Butylaminopropylmethacrylat. N,N-Dimethylaminoethylmethacrylat und N,N-Dimethylaminopropylmethacrylat sind besonders bevorzugt. Die Aminogruppen können in den erfindungsgemäßen Perlpolymerisaten ganz oder teilweise in protonierter Form, z.B. als Hydrochloride vorliegen.

10 Als Vernetzer kommen in Frage: Ethylenglycoldimethacrylat, Butandioldimethacrylat, Hexandioldimethacrylat, Pentaerytritoldimethacrylat, 1,2-Glycerindimethacrylat, 1,3-Glycerindimethacrylat, Triethylenglycoldimethacrylat, Tetraethylenglycoldimethacrylat, Trimethylolpropantrimethacrylat, Pentaerytritoltrimethacrylat, Pentaerytritoltetramethacrylat, Ethylenglycoldiacrylat, Butandioldiacrylat, Pentaerytritoldiacrylat, 1,3-Glycerindiacrylat, Triethylenglycoldiacrylat, Trimethylolpropantriacrylat, Pentaerytritoltriacrylat, Pentaerytritoltetraacrylat, Allylmethacrylat, Allylacrylat, Diethylenglycoldivinylether und Methylen-N,N'-bisacrylamid. Methylen-N,N'-bisacrylamid ist bevorzugt.

20 Die Menge an hydrophilem (Meth)acrylat beträgt 30 bis 89 Gew.%, vorzugsweise 40 bis 75 Gew.%, die Menge und Amino(meth)acrylate 10 bis 69 Gew.%, vorzugsweise 20 bis 50 Gew.% und die Menge an Vernetzer 1 bis 25 Gew.%, jeweils bezogen auf die Summe aus hydrophilem (Meth)acrylat, Amino(meth)acrylate und Vernetzer.

25 Der Gehalt an Eisenoxid in den erfindungsgemäßen superparamagnetischen Perlpolymerisaten beträgt 2 bis 80 Gew.%, vorzugsweise 4 bis 50 Gew.%, besonders bevorzugt 5 bis 35 Gew.%, bezogen auf das Gewicht der ungequollenen Perlpolymerisate.

30 Die erfindungsgemäßen Perlpolymerisate sind superparamagnetisch, das heißt sie besitzen eine niedrige Restmagentisierung (Remanenz) und eine kleine Koerzitiv-

kraft. Ihre magnetische Sättigung ist hoch, sie werden von einem inhomogenen Magnetfeld stark angezogen. Nach Ausschalten des Magnetfeldes lassen sie sich leicht und vollständig in Wasser oder wässrigen Pufferlösungen dispergieren.

5 Die Teilchengröße der erfindungsgemäßen superparamagnetischen Perlpolymerisate beträgt 1 bis 200  $\mu\text{m}$ , vorzugsweise 5 bis 100, besonders bevorzugt 10 bis 50  $\mu\text{m}$ . Zur Bestimmung der mittleren Teilchengröße ( $\bar{\phi}$ ) und der Teilchengrößenverteilung ist die mikroskopische Bildanalyse gut geeignet.

10 Als Maß für die Breite der Teilchengrößenverteilung der Perlpolymerisate wird das Verhältnis aus dem Mittelwert der Volumenverteilung ( $D_V$ ) und dem Mittelwert der Anzahlverteilung ( $D_Z$ ) gebildet. Enge Teilchengrößenverteilungen im Sinne der Erfindung bedeuten  $D_V/D_Z \leq 2,5$ , bevorzugt  $D_V/D_Z \leq 2$ , besonders bevorzugt  $D_V/D_Z \leq 1,5$ . Es wurde gefunden, dass erfindungsgemäße Perlpolymerisate mit enger Teilchengrößenverteilung besonders gut zur Isolierung von Nucleinsäuren geeignet sind und bei Amplifikationsverfahren an der Oberfläche der Perlpolymerisate besonders gut reproduzierbare Ergebnisse liefern.

15

20 Die erfindungsgemäßen Perlpolymerisate besitzen eine Quellbarkeit in Wasser. Sie besitzen einen Quellungsindex von 1,25 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 (gemessen bei 25°C). Als Quellungsindex ist der Quotient aus dem Volumen des gequollenen Perlpolymerisates und dem Volumen des nicht gequollenen Perlpolymerisates definiert.

25 Zur experimentellen Bestimmung des Quellungsindex werden 10 ml getrocknetes, gesiebtes Perlpolymerisat in einem 100 ml-Standzyylinder eingewogen. Der Quotient aus dem Volumen der Schüttung ( $V_0$ ) und der eingewogener Menge (m) ergibt das Schüttvolumen ( $V_{sch}$ ). Der Standzyylinder wird mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt und 10 bis 20 h bei 25° stehen gelassen. Dabei wurde öfter geschüttelt und darauf geachtet, dass eventuell auftretende Luftblasen entweichen können. Das Volumen der

30

gequollenen Schüttung wird abgelesen und ergibt  $V_1$ . Der Quotient aus  $V_1$  und  $V_0$  ist der Quellungsindex.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung vernetzter Perlpolymerisate, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass man ein Monomergemisch aus hydrophilem (Meth)acrylat, Amino(meth)acrylat, Vernetzer und gegebenenfalls weiterem Monomer zu Perlen durch umgekehrte Suspensionspolymerisation polymerisiert und diese anschließend durch eine Nachbehandlung mit Eisensalz-Lösung mit superparamagnetischen Eisenoxid dotiert.

Unter umgekehrter Suspensionspolymerisation im Sinne der Erfindung wird ein Verfahren verstanden, bei dem das Monomergemisch aus hydrophilem (Meth)acrylat, Amino(meth)acrylat, Vernetzer und gegebenenfalls weiterem Monomer mit einem im Monomergemisch löslichen Radikalbildner aktiviert wird und das aktivierte Monomergemisch unter Zusatz eines Dispergierhilfsmittels in einem nicht wässrigem Lösungsmittel zu Tröpfchen emulgiert wird und dann die gebildeten Tröpfchen durch Temperaturerhöhung ausgehärtet werden.

Das hydrophile (Meth)acrylat, das Amino(meth)acrylat und der Vernetzer entsprechen den oben genannten Verbindungen. Das Amino(meth)acrylat kann dabei in vorteilhafter Weise zumindest teilweise in der Ammoniumform, beispielsweise als Hydrochlorid eingesetzt werden. Als weiteres Monomer kommen in Mengen von bis zu ca. 25 Gew.% bezogen auf das Gesamtmonomergemisch beispielsweise N-Vinylpyrrolidon, Vinylimidazol, Styrol, alfa-Methylstyrol, Chlormethylstyrol, Acrylnitril, Vinylacetat und Maleinsäureanhydrid in Frage. Es ist günstig, das Monomergemisch mit Wasser oder Wasser-Alkoholgemischen zu verdünnen. Geeignete Mengen an Verdünnungsmittel sind beispielsweise 10 bis 200 Gew.%, vorzugsweise 50 bis 150 Gew.% bezogen auf das Monomergemisch.

Als Radikalbildner sind Azoverbindungen und Peroxiverbindungen geeignet. Bei Verwendung von Wasser als Verdünnungsmittel ist Kaliumperoxodisulfat und

Natriumperoxodisulfat, auch in Kombination mit Bisulfit oder Hydogensulfit, gut geeignet. Weitere bevorzugte Radikalbildner sind die Azoverbindungen, wie 2,2'-Azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propane]dihydrochlorid und 2,2'-Azobis(2-amidino-propan)dihydrochlorid. Der Radikalbildner wird in Mengen von 0,02 bis 2,5 Gew.%, vorzugsweise von 0,1 bis 1 Gew.% bezogen auf Gesamtmonomergemisch verwendet.

Als nicht wässriges Lösungsmittel im Sinne der vorliegenden Erfindung sind in erster Linie Kohlenwasserstoffe und Halogenkohlenwasserstoffe, sowie niedrig viskose Siliconöle geeignet. Bevorzugt sind lineare, verzweigte und cyclische aliphatische Kohlenwasserstoffe. Beispielhaft sei erwähnt Hexan, Heptan, n-Octan, iso-Octan, iso-Dodecan und Cyclohexan. Natürlich können auch Mischungen aus unterschiedlichen Kohlenwasserstoffen verwendet werden.

Als Dispergierhilfsmittel sind öllösliche Polymerisate mit einem Molekulargewicht von 2000 bis 1 000 000 geeignet. Bevorzugt sind Polymerisate mit einem Anteil von einpolymerisierten Einheiten von C<sub>6</sub>- bis C<sub>22</sub>-Alkyl(meth)acrylaten und/oder Vinyl-ester von C<sub>6</sub>- bis C<sub>22</sub>-Carbonsäuren. Beispielhaft seien Polymerisate mit einpolymerisierten Einheiten von Stearylmethacrylat, Laurylmethacrylat und Vinylstearat genannt. Besonders gut geeignet sind Copolymerisate aus C<sub>6</sub>- bis C<sub>22</sub>-Alkyl(meth)acrylaten bzw. Vinylester von C<sub>6</sub>- bis C<sub>22</sub>-Carbonsäuren und hydrophilen Monomeren. Unter hydrophilen Monomeren werden in diesem Zusammenhang polymerisierbare olefinisch ungesättigte Verbindungen, die ganz oder teilweise (zu mehr als 2,5 Gew.-% bei 20 °C) in Wasser löslich sind, verstanden. Als Beispiele seien genannt: Acrylsäure und ihre Alkali- und Ammoniumsalze, Methacrylsäure und ihre Alkali- und Ammoniumsalze, Hydroxyethylmethacrylat, Hydroxyethylacrylat, Diethylenglykolmonoacrylat, Diethylenglykolmonomethacrylat, Triethylenglykolmonoacrylat, Triethylenglykolmonomethacrylat, Tetraethylenglykolmonoacrylat, Tetraethylenglykolmonomethacrylat, Glycerinmonoacrylat, Aminoethylmethacrylat, N,N-Dimethylaminoethylmethacrylat, Acrylamid, Methacrylamid, Vinylpyrrolidon und Vinylimidazol. Bevorzugt werden Hydroxyethylmethacrylat, Aminoethyl-

methacrylat, N,N-Dimethylaminoethylmethacrylat, Acrylamid, Methacrylamid, Vinylpyrrolidon und Vinylimidazol.

Besonders bevorzugte Dispergierhilfsmittel sind Copolymerisate aus

5

- 75 bis 99 Gew.% C<sub>6</sub>- bis C<sub>22</sub>-Alkyl(meth)acrylat und/oder Vinylester von C<sub>6</sub>- bis C<sub>22</sub>-Carbonsäuren und
- 1 bis 25 Gew.% hydrophiles Monomer aus der Gruppe Hydroxyethylmethacrylat, Aminoethylmethacrylat, N,N-Dimethylaminoethylmethacrylat, Acrylamid, Methacrylamid, Vinylpyrrolidon und Vinylimidazol.

10

Die Einsatzmenge des Dispergierhilfsmittels beträgt im allgemeinen 0,1 bis 8, vorzugsweise 0,5 bis 5 Gew.-%, bezogen auf das nicht wässrige Lösungsmittel.

15

Die Rührgeschwindigkeit bei der Polymerisation ist wichtig für die Einstellung der Teilchengröße. Beim erfindungsgemäßen Verfahren nimmt die Größe der erhaltenen Perlpolymerisate mit zunehmender Rührerdrehzahl ab. Die exakte Rührdrehzahl zur Einstellung einer bestimmten vorgegebenen Perlgröße hängt im Einzelfall stark von der Reaktorgröße, der Reaktorgeometrie und der Rührergeometrie ab. Es hat sich als zweckmäßig erwiesen, die notwendige Rührdrehzahl experimentell zu ermitteln. Für Laborreaktoren mit 0,5l-Reaktionsvolumen, die mit Gitterrührer ausgestattet sind, werden bei Verwendung von Copolymerisaten aus Methacrylsäure-C<sub>13</sub>-Ester und Hydroxyethylmethacryl als Dispergierhilfsmittel im allgemeinen Perldurchmesser von 10 bis 25 µm bei Drehzahlen von 800 bis 1000 Upm erreicht.

20

25

Die Polymerisationstemperatur richtet sich nach der Zerfallstemperatur des eingesetzten Initiators und der Siedetemperatur des nicht wässrigen Lösungsmittels. Sie liegt im allgemeinen zwischen 50 bis 150 °C, vorzugsweise zwischen 55 und 100 °C. Die Polymerisation dauert 0,5 bis einige Stunden (beispielsweise 10 Stunden).

30

Nach der Polymerisation kann das Polymerisat mit üblichen Methoden, z.B. durch Filtrieren oder Dekantieren, isoliert und gegebenenfalls nach ein oder mehreren Waschvorgängen getrocknet werden. Es ist möglich, das erhaltene Perpolymerisat durch physikalischen Methoden zu fraktionieren, um eine engere Teilchen-  
5 größenverteilung einzustellen. Geeignete Fraktionierungsmethoden sind beispielsweise Sieben, Sedimentieren und Windsichten.

Die Nachbehandlung zur Dotierung mit superparamagnetischen Eisenoxid erfolgt mit Mischungen aus wässrigen  $Fe^{2+}$ - und  $Fe^{3+}$ -salz-Lösungen. Gut geeignet sind die entsprechende Chloride. Das molare Verhältnis von  $Fe^{2+}$ :  $Fe^{3+}$  soll dabei 2:1 bis 1:2 betragen. Dabei ist es möglich von Eisensalzlösungen mit einem anderen  $Fe^{2+}$ :  $Fe^{3+}$ -Verhältnis auszugehen und das optimale Verhältnis von  $Fe^{2+}$ :  $Fe^{3+}$  durch Verwendung von Oxidations- bzw. Reduktionsmitteln einzustellen. Beispiele für Oxidationsmittel sind Peroxo- und Nitroverbindungen, als Reduktionsmittel ist z.B. Natriumbisulfit geeignet. Die Konzentration der Eisensalzlösungen beträgt im allgemeinen 10 bis 50 Gew.%, vorzugsweise 20 bis 40 Gew.%.  
10  
15

Die Eisensalzlösung wird vorzugsweise mit getrocknetem, wasserfreien Perpolymerisat in Kontakt gebracht. Dabei ist es besonders vorteilhaft, wenn die gesamte Eisensalzlösung in das Perpolymerisat einquillt und keine überschüssige Eisensalzlösung in den Zwischenräumen der Perlen oder an der Oberfläche der Perlen verbleibt.  
20

Die in das Perpolymerisat eingequollenen Eisensalze werden durch Zusatz von Basen in die entsprechende Eisenhydroxide überführt. Gut geeignet sind alkalische Lösungen aus Natriumhydroxid, Natriumcarbonat oder Ammoniak. Ammoniak ist bevorzugt, da ein Überschuss leicht durch Abdampfen entfernt werden kann. Gebildete Ammoniumsalze werden durch gründliches Waschen mit Wasser entfernt.  
25

30 Zur Überführung des Eisenhydroxids in Eisenoxid (Dehydratisierung) wird das Perpolymerisat erhitzt. Die Wärmebehandlung kann dabei in einfacher Weise in

wässriger Suspension bei 65 bis 100°C erfolgen. Geeigete Zeiten für die Erhitzung sind 0,5 bis 5 Stunden. Die Umwandlung des Eisenhydroxids in Eisenoxid ist an einen Wechsel der Farbe von hell braun nach dunkelbraun bis schwarz erkennbar. Danach wird das Perlpolymerisat abgetrennt und getrocknet.

5

Falls gewünscht können die so erhaltenen getrockneten mit superparamagnetischen Eisenoxid dotierten Perlpolymerisate ein weiteres Mal in der oben beschriebenen Weise behandelt werden, wobei der Gehalt an superparamagnetischen Eisenoxid gesteigert wird. Auf diese Weise gelingt es Eisenoxidegehalte von mehr als 50 Gew.% einzustellen.

10

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäuren aus einer Probe, umfassend die nachfolgenden Schritte

15

- A) Vermischen der Probe mit einem Perlpolymerisat bei einem pH-Wert von 7 oder weniger, wobei die Nucleinsäuren adsorbiert werden,
- B) Abtrennen des Perlpolymerisates einschließlich der adsorbierten Nuklein-säuren unter Anwendung eines Magnetfeldes

20

und

- C) Vermischen des Perlpolymerisates mit einer wässrigen Phase mit einem pH-Wert von größer 7, wobei die adsorbierten Nucleinsäuren freigesetzt werden,

25

welches dadurch gekennzeichnet ist, dass das Perlpolymerisat mit superparamagne-tischen Eisenoxid dotiert ist und einpolymerisierte Einheiten aus hydrophilem (Meth)acrylat und Amino(meth)acrylate enthält.

30

Das erfindungsgemäße Verfahren ist zur Isolierung und/oder Reinigung von Nuclein-säuren unterschiedlicher Herkunft, beispielsweise aus Zellen, Gewebematerialien,

Blut oder Infektionserregern geeignet. Vor der Isolierung der Nucleinsäuren wird das zu untersuchende Material durch an sich bekannte Techniken, wie z.B. Aufschluss durch Proteaseverdau aufgeschlossen, wobei eine für die weiteren Schritte A bis C geeignete Probe, ein Lysat, erhalten wird. Gegebenenfalls erfolgt in einem Zwischen-  
5 schritt nach Verfahrensschritt A) die Lyse des biologischen Materials. Weitere geeignete Aufschlussverfahren sind in DE-A-4 333 805 beschrieben worden.

Es erfolgt das Vermischen der Probe mit dem erfindungsgemäßen Perlpolymerisat bei einem pH-wert von 7 oder weniger, vorzugsweise im Bereich von 2 bis 6,  
10 besonders bevorzugt im Bereich von 2 bis 3 bei Raumtemperatur. Das Abtrennen des Perlpolymerisates erfolgt mit Hilfe eines Magnetfeldes. Der so gewonnene Komplex aus Nucleinsäure und Perlpolymerisat kann nun durch Waschen mit geeigneten Puffern gereinigt werden.

15 Zur Freisetzung der gebundenen Nucleinsäuren aus dem Komplex erfolgt nun die pH-Einstellung des Komplexes auf pH-Werte oberhalb von 7, vorzugsweise von 8 bis 14, besonders bevorzugt im Bereich 12 bis 14.

20 Die erfindungsgemäßen Perlpolymerisate liefern höhere Adsorption- und Wiederfreisetzungsraten als die löslichen Polymerisate gemäß EP-A-0 707 077. Die Isolierung lässt sich leichter, d.h. mit weniger Arbeitsschritten und in kürzeren Zeiten durchführen. Die Reinheit der isolierten Nucleinsäuren ist höher, insbesondere enthalten sie weniger inhibierende Nebenprodukte, so dass eine Verstärkung der Nucleinsäuren, beispielsweise durch die sogenannte "PCR-Reaktion" und die "RT-PCR" 25 besonders gut gelingt. Auch in Bezug auf Verdau der gewonnenen Nucleinsäuren mittels Restriktionsenzymen ist das erfindungsgemäße Verfahren der in der EP-A-0 707 077 beschriebenen Methode überlegen.

30 Die erfindungsgemäßen Perlpolymerisate sind auch gut geeignet, um eine Verstärkung der adsorbierten Nukleinsäuren beispielsweise durch die sogenannte

„Taqman-PCR-Reaktion“ direkt auf den Perlpolymerisaten (d.h. ohne Teilschritt C) durch zuführen.

**Beispiel 1**

## Herstellung eines erfindungsgemäßen Perlpolymerisates

5 1a) Herstellung eines Dispergierhilfsmittels

In einem 4 l-Reaktionsgefäß mit Gitterrührer, Gaseinlass- und Gasauslassrohr wurde unter Stickstoffbegasung eine Lösung aus 1324 g Cyclohexan, 511 g Methacrylsäure-C<sub>13</sub>-Ester, 57 g Hydroxyethylmethacrylat und 3,8 g Dibenzoylperoxyd innerhalb von 2 h bei 300 Upm auf 78°C erhitzt, 10 h bei dieser Temperatur belassen, anschließend 10 auf 90°C erhitzt und weitere 1,5 h bei dieser Temperatur belassen. Danach wurde auf 25°C abgekühlt. Man erhielt 1835 g einer 30,5 gew.-%igen Lösung eines Dispergiermittels. Der Staudinger-Index, gemessen mit Ubbelohde-Viskosimeter bei 25°C, betrug 72,6 ml/g.

15 1b) Herstellung eines vernetzten Perlpolymerisates

In einem 0,5 Liter-Reaktionsgefäß mit Gitterrührer, Rückflusskühler und Thermofühler wurden 41,25 g Dispergiermittel-Lösung aus 1a) und 240 g Cyclohexan vorgelegt und gerührt. 9,38 g N,N-Dimethylaminoethylmethacrylat wurde mit 13,3 g Wasser und 5,89 g 37 %iger Salzsäure 5 Minuten gerührt und mit 0,6 g 1n NaOH neutralisiert. Anschließend wurde diese Lösung in das Reaktionsgefäß gegeben. Zu dieser Mischung wurden 20,31 g Acrylamid und 1,56 g Methylen-N,N'-bisacrylamid, gelöst in 8 g Methanol, zugegeben. Diese Reaktionsmischung wurde mit 0,063 g Kaliumperoxidisulfat, gelöst in einer Mischung aus 4,25 g Wasser und 2 g Methanol, versetzt und bei 450 Upm 10 Minuten mit Stickstoffgas gespült. 20 Anschließend wurde die Rührgeschwindigkeit auf 1000 Upm gesteigert und die Temperatur innerhalb von 1 Stunde auf 60 °C erhöht und 10 Stunden bei dieser Temperatur belassen. Nach dem Abkühlen wurde das entstandene Polymerisat durch Dekantieren von der Reaktionslösung abgetrennt und je dreimal mit Cyclohexan, Wasser und Methanol gereinigt und bei 40°C im Vakuumtrockenschrank getrocknet. 25 Anschließend wurde die Rührgeschwindigkeit auf 1000 Upm gesteigert und die Temperatur innerhalb von 1 Stunde auf 60 °C erhöht und 10 Stunden bei dieser Temperatur belassen. Nach dem Abkühlen wurde das entstandene Polymerisat durch Dekantieren von der Reaktionslösung abgetrennt und je dreimal mit Cyclohexan, Wasser und Methanol gereinigt und bei 40°C im Vakuumtrockenschrank getrocknet. 30 Man erhielt 14,7 g getrocknetes Perlpolymerisat mit einer mittleren Teilchengröße von 12 µm und einem Quellungsindex von 6 bei 25°C in Wasser.

1c) Dotierung des Perlpolymerisates mit Eisenoxid

In einem Rührgefäß mit einem Magnetrührer und Thermometer wurden 3,625 g Eisen(II)chlorid-Tetrahydrat, 1,5 g Eisen (III) )chlorid (wasserfrei) und 0,3 g 5 Natriumbisulfit in 5,75 ml Wasser gelöst.

In einem 100 ml Dreihalskolben wurden 5 g getrocknetes Perlpolymerisat (1b) vorgelegt und extern mit Eis gekühlt und anschließend mit der oben beschriebenen Eisensalzlösung versetzt. Die entstehende Suspension wurde 35 Minuten gerührt und 10 anschließend mit kochendem Wasser extern erwärmt bis aus der Suspension eine feste Mischung entstanden war. Anschließend wurde das Perlpolymerisat in einem anderen 500 ml Kolben mit einer alkalischen Lösung aus 67,5 ml Wasser und 8,5 ml 26%iger Ammoniak-Lösung (pH = 9) 1 Stunde gerührt und mit 250 ml Wasser verdünnt. Nach dem Abdekantieren der Lösung wurde dieser Vorgang mehrfach 15 wiederholt.

Das mit Eisensalzlösung behandelte Perlpolymerisat wurden mit 300 ml Wasser versetzt und unter Luftstrom 30 Minuten gerührt und anschließend auf 72°C erwärmt. Der pH-Wert wurde während des gesamten Vorgangs durch Zugabe von 20 Ammoniaklösung auf 9 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung mit 0,155 g Kaliumperoxodisulfat versetzt und weitere 2,5 Stunden bei 72°C erwärmt. Nach dem Abdekantieren der Flüssigkeit wurde der Feststoff fünfmal mit Wasser gewaschen und dabei mit Ultraschall behandelt. Man erhielt 5,1 g schwarzes Perlpolymerisat mit 25 einem Eisengehalt von 6 Gew.%, welches von einem inhomogenen Magnetfeld stark angezogen wird.

**Beispiel 2**

## Herstellung eines erfindungsgemäßen Perlpolymerisates

**2a) Herstellung eines vernetzten Perlpolymerisates**

5 In einem 0,5 Liter-Reaktionsgefäß mit Gitterührer, Rückflusskühler und Thermoführer wurden 41 g Dispergierhilfsmittel-Lösung aus 1a) und 240 g Cyclohexan vorgelegt und gerührt. 9,38 g N,N-Dimethylaminoethylmethacrylat wurde mit 13,3 g Wasser und 6 g 37 %ige Salzsäure 5 Minuten gerührt. Anschließend wurde diese Lösung in das Reaktionsgefäß gegeben. Zu dieser Mischung wurde 18,75 g Acrylamid und 3,13 g Methylen-N,N'-bisacrylamid, gelöst in 8 g Methanol, zugegeben. Diese Reaktionsmischung wurde mit 0,313 g 2,2'-Azobis(2-amidinopropan)-dihydrochlorid, gelöst in einer Mischung aus 4,25 g Wasser und 2 g Methanol, versetzt und bei 450 Upm 10 Minuten mit Stickstoffgas gespült. Anschließend wurde die Temperatur innerhalb von 1 Stunde bei 800 Upm auf 60°C erhöht und 10 Stunden bei dieser Temperatur reagieren lassen. Nach dem Abkühlen wurde das entstandene Polymerisat durch Dekantieren von der Reaktionslösung abgetrennt und je dreimal mit Cyclohexan, Wasser und Methanol gereinigt und bei 40°C im Vakuumtrockenschrank getrocknet. Man erhielt 15 g getrocknetes Perlpolymerisat mit einer mittleren Teilchengröße von 20 µm und einem Quellungsindex von 5 bei 20 25°C in Wasser.

**2b) Dotierung des Perlpolymerisates mit Eisenoxid**

5 g des Perlpolymerisates aus 2a) wurde wie unter 1d) beschrieben mit Eisenoxid dotiert. Dabei wurde der gesamte Vorgang zweifach durchgeführt. Man erhielt 5,4 g schwarzes Perlpolymerisat mit einem Eisengehalt von 8,3 Gew.%, welches von einem inhomogenen Magnetfeld stark angezogen wird.

**Patentansprüche**

1. Vernetzte Perlpolymerisate dotiert mit superparamagnetischen Eisenoxid und enthaltend basische Aminogruppen, dadurch gekennzeichnet, dass die Perlpolymerisate einpolymerisierte Einheiten aus hydrophilem (Meth)acrylat und Amino(meth)acrylate erhalten.  
5
2. Vernetzte Perlpolymerisate nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das hydrophile (Meth)acrylat (Meth)acrylamid ist.  
10
3. Vernetzte Perlpolymerisate nach Anspruch 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Amino(meth)acrylat ein Aminoalkylmethacrylat ist.  
15
4. Vernetzte Perlpolymerisate nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Perlpolymerisate einpolymerisierte Einheiten aus (Meth)acrylamid und Dialkylaminoalkyl(meth)acrylate und Methylenbis(meth)acrylamid als Vernetzer enthalten.  
20
5. Vernetzte Perlpolymerisate nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Teilchengröße von 5 bis 100  $\mu\text{m}$  besitzen.  
25
6. Vernetzte Perlpolymerisate nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Teilchengrößenverteilung  $D_V/D_Z$  kleiner als 2,5 ist.  
30
7. Verfahren zur Isolierung von Nucleinsäuren unter Verwendung der Perlpolymerisaten gemäß Anspruch 1 bis 6.
8. Verfahren zur Herstellung vernetzter Perlpolymerisate, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Monomergemisch aus hydrophilem (Meth)acrylat, Amino(meth)acrylate, Vernetzer und gegebenenfalls weiteren Monomeren zu Perlen durch umgekehrte Suspensionspolymerisation polymerisiert und diese

durch eine Nachbehandlung mit Eisensalzlösung mit superparamagnetischen Eisenoxid dotiert.

9. Verfahren zur Herstellung vernetzter Perlpolymerisate nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass Amino(meth)acrylate teilweise oder ganz in Form eines Ammoniumsalzes eingesetzt wird.
- 5
10. Verfahren zur Amplifikation von Nucleinsäuren durch PCR, insbesondere Taqman PCR auf der Oberfläche von Partikeln, dadurch gekennzeichnet, dass die Partikel Perlpolymerisate gemäß Anspruch 1 bis 6 sind.
- 10

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
I U, EP 01/07326

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C08K9/08 C08K9/10 G01N33/50 C12Q1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C08K G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 199937 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A89, AN 1999-435595 XP002184095 &amp; JP 11 176622 A (NIPPON GOSEI GOMU KK), 2 July 1999 (1999-07-02) abstract</p> <p>---</p> <p>EP 0 707 077 A (JOHNSON &amp; JOHNSON CLIN DIAG) 17 April 1996 (1996-04-17) cited in the application page 6, line 32 claim 1</p> <p>---</p> <p>-/-</p>	1-10
Y		1-10

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 November 2001

Date of mailing of the international search report

11/12/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Siemens, T

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. onal Application No  
EP 01/07326

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 199 12 799 A (AGOWA GES FUER MOLEKULARBIOLOG) 16 September 1999 (1999-09-16) claims 1-19 -----	1-10

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int'l Application No	P 01/07326
----------------------	------------

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)			Publication date
JP 11176622	A 02-07-1999	NONE			
EP 0707077	A 17-04-1996	US	5582988 A	10-12-1996	
		AU	706641 B2	17-06-1999	
		AU	3030295 A	28-03-1996	
		CA	2158485 A1	16-03-1996	
		EP	0707077 A2	17-04-1996	
		FI	954331 A	16-03-1996	
		JP	8173194 A	09-07-1996	
		NO	953631 A	18-03-1996	
DE 19912799	A 16-09-1999	DE	19912799 A1	16-09-1999	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int	nales Aktenzeichen
P	P 01/07326

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
 IPK 7 C08K9/08 C08K9/10 G01N33/50 C12Q1/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
 IPK 7 C08K G01N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie <sup>o</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>DATABASE WPI          Section Ch, Week 199937          Derwent Publications Ltd., London, GB;          Class A89, AN 1999-435595          XP002184095          &amp; JP 11 176622 A (NIPPON GOSEI GOMU KK),          2. Juli 1999 (1999-07-02)          Zusammenfassung          ---</p>	1-10
Y	<p>EP 0 707 077 A (JOHNSON &amp; JOHNSON CLIN          DIAG) 17. April 1996 (1996-04-17)          in der Anmeldung erwähnt          Seite 6, Zeile 32          Anspruch 1          ---          -/-</p>	1-10

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- ° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- A° Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- E° älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- L° Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchebericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- O° Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- P° Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- T° Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- X° Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- Y° Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist
- &° Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

27. November 2001

11/12/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Siemens, T

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Int	nales Aktenzeichen
P.., L	P 01/07326

**C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie <sup>a</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 199 12 799 A (AGOWA GES FUER MOLEKULARBIOLOG) 16. September 1999 (1999-09-16) Ansprüche 1-19 -----	1-10

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/07326

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
JP 11176622	A	02-07-1999	KEINE		
EP 0707077	A	17-04-1996	US 5582988 A		10-12-1996
			AU 706641 B2		17-06-1999
			AU 3030295 A		28-03-1996
			CA 2158485 A1		16-03-1996
			EP 0707077 A2		17-04-1996
			FI 954331 A		16-03-1996
			JP 8173194 A		09-07-1996
			NO 953631 A		18-03-1996
DE 19912799	A	16-09-1999	DE 19912799 A1		16-09-1999